# 产品简介

**miRNA 产品使用说明**

miRNA mimic 是 miRNA 模拟物，化学合成的成熟 miRNA 双链，产品为冻干粉形式的即用型试剂；

miRNA inhibitor 是 miRNA 抑制物，化学修饰的成熟 miRNA 互补单链，产品为冻干粉形式的即用型试剂；

miRNA agomir 是特殊化学修饰的 miRNA 激动剂，适用于细胞实验、动物实验，产品为冻干粉形式的即用型试剂；

miRNA antagomir 是特殊化学修饰的 miRNA 拮抗剂，适用于细胞实验、动物实验，产品为冻干粉形式的即用型试剂

# 运输保存

产品以冻干粉的形式常温运输。收到产品后，请于-20℃～-80℃保存，冻干粉可以稳定保存一年。

使用前瞬时离心，用 RNase-free H2O 或灭菌 ddH2O 配制成 20μM 储存液，分装保存，避免反复冻融（建议不超过 5 次）。

**表 1** 20 μM 储存液的配置方法

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| miRNA(nmol) | 2.5 | 5 | 10 | 50 |
| 溶解体积(μl) | 125 | 250 | 500 | 2500 |

注：1OD duplex=2.5nmols=40μg

### 使用须知：

1. miRNA 产品呈很轻的干膜状附在管壁上，打开管子前先离心，然后再慢慢打开管盖，溶解时请加足量 RNase-free H2O 或灭菌 ddH2O 后盖上管盖，震荡溶解。
2. 为避免外界因素(包括酶，极端 pH 或者温度条件等)导致产品降解，所有操作请严格遵循 RNA 操作规则。实验过程中，产品最好于冰上放置，使用完毕后请于-20℃～-80℃小心保存。

# 细胞实验方法：

为了降低细胞密度、试剂用量，转染效率等因素导致的孔间差异，保证实验的可靠性和可重复性,Biomics 建议：

1. 转染实验中每个转染样品至少设置 3 个复孔；
2. 接种细胞时，每孔接种的细胞数量尽量保持一致，尽量使细胞在各孔的表面平均分布。

### 转染浓度：

* 1. 为了获得最佳基因阻断结果，每一种细胞系转染 miRNA 的量都需要经过实验确定。如果您是首次转染您的细胞系， 推荐尝试使用几个 LipofectamineTM 2000 的浓度，并在 20-100nM 范围内改变 miRNA 的浓度，以确定达到最佳基因阻断水平所需要的条件。高浓度的 miRNA 可能具有细胞系依赖性。
  2. 在 30-50％细胞汇合度时进行转染。通常基因沉默分析至少要在转染后 24-72 小时进行。低密度转染细胞可以使转染和分析之间更长的间隙更长，从而使由于细胞过度生长造成的细胞活性损害减少到最低。根据靶基因的特性，高密度转染的细胞可能更加适合条件的优化。
  3. 不要在转染时的培养基中加入抗生素，因为这将会降低细胞转染的效率和导致细胞死亡。
  4. 为了获得更好的结果，可以使用 Invitrogen 的 Opti-MEM 低血清培养基在形成复合物前稀释 LipofectamineTM 2000 和 miRNA。 可以使用荧光标记的 miRNA 帮助优化细胞系的转染条件。一旦确定了用来转染的最佳条件，可以在每一次实验都包括荧光标记 miRNA，作为转染效率的指示剂.

**注：**miRNA inhibitor 往往需要用到较大的用量才能观察到较好的抑制效果，相当于 miRNA mimic 的几倍用量，

这可能与 miRNA inhibitor 竞争性抑制的作用机制及作用效率有关。因此，当使用推荐的转染浓度没有获得预期效果时，可适当选择更高的浓度（表 3 ）或选择antagomir（无需转染试剂）进行实验.

### 转染步骤：

以 LipofectamineTM 2000 转染 miRNA 于 24 孔板，转染浓度为 50nM 为例，其他规格容器转染请参考表 2。

1. **接种细胞**

**贴壁细胞：**转染前 24 hrs，在 400 µL 无抗培养基中接种 0.5 - 2×105 个细胞，转染时细胞融合度为 30 - 50%。(注：铺板时要将细胞消化完全混匀，避免细胞堆积生长。)

**悬浮细胞：**转染前 24 hrs，在 400 µL 无抗培养基中接种 0.5 - 2×105 个细胞，转染时细胞数量应在 4 - 8

×105/孔。

1. **转染步骤**
   1. 用 50 µL Opti-MEM 稀释 miRNA (转染细胞的终浓度为 50 nM) ，轻轻吹吸 3 - 5 次混匀。
   2. 轻轻颠倒混匀转染试剂，用 50µL Opti-MEM 稀释 1.0 µL LipofectamineTM 2000，轻轻吹吸 3 – 5 次混匀，室温下静置 5 min。
   3. 混合转染试剂和 miRNA 稀释液，轻轻吹吸 3 - 5 次混匀，室温下静置 20 min。
   4. 转染复合物加入到 24 孔细胞板中，100 µL/孔，前后轻摇细胞板混合均匀。
   5. 细胞板置于 37℃、5% CO2 培养箱中培养 18 - 48 hrs。转染 4 - 6 hrs 后可换新鲜培养基表**表 2** 使用 lipofectamine2000(invitrogen)转染 miRNA 产品用量参考

V1：完全或不完全培养基；v2: Opti-MEM® I (无血清、无抗生素，转染专用)

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 每孔中总体积(v1+v2+v2) | miRNA 终浓度 | miRNA 产品 | lipo2000/孔 | DNA 共转染† |
| 96-well | 100µl (50µl+25µl+25µl) | 100nM | 0.5µl | 0.25µl | 10~100ng |
| 100µl (50µl+25µl+25µl) | 50nM | 0.25µl | 0.25µl | 10~100ng |
| 100µl (50µl+25µl+25µl) | 30nM | 0.15µl | 0.25µl | 10~100ng |
| 100µl (50µl+25µl+25µl) | 20nM | 0.1µl | 0.25µl | 10~100ng |
| 100µl (50µl+25µl+25µl) | 10nM | 0.05µl | 0.25µl | 10~100ng |
| 24-well  \* | 500µl (400µl+50µl+50µl) | 100nM | 2.5µl | 1µl | 100~200ng |
| 500µl (400µl+50µl+50µl) | 50nM | 1.25µl | 1µl | 100~200ng |
| 500µl (400µl+50µl+50µl) | 30nM | 0.75µl | 1µl | 100~200ng |
| 500µl (400µl+50µl+50µl) | 20nM | 0.5µl | 1µl | 100~200ng |
| 500µl (400µl+50µl+50µl) | 10nM | 0.25µl | 1µl | 100~200ng |
| 12-well | 1mL (800µl+100µl+100µl) | 100nM | 5µl | 2µl | 200~400ng |
| 1mL (800µl+100µl+100µl) | 50nM | 2.5µl | 2µl | 200~400ng |
| 1mL (800µl+100µl+100µl) | 30nM | 1.5µl | 2µl | 200~400ng |
| 1mL (800µl+100µl+100µl) | 20nM | 1.0µl | 2µl | 200~400ng |
| 1mL (800µl+100µl+100µl) | 10nM | 0.5µl | 2µl | 200~400ng |
| 6-well | 2mL (1500µl+250µl+250µl) | 100nM | 10µl | 5µl | 500~1000ng |
| 2mL (1500µl+250µl+250µl) | 50nM | 5µl | 5µl | 500~1000ng |
| 2mL (1500µl+250µl+250µl) | 30nM | 3µl | 5µl | 500~1000ng |
| 2mL (1500µl+250µl+250µl) | 20nM | 2µl | 5µl | 500~1000ng |
| 2mL (1500µl+250µl+250µl) | 10nM | 1µl | 5µl | 500~1000ng |

\*：实验参考用量示例; †：当实验涉及 DNA 共转时参考。

## 效果检测：

miRNA agomir 和antagomir 作用效果往往通过功能方面检测，转染完成后 2 4 ~ 7 2 小时均可进行检测，最佳检测时间与细胞类型及研究的 miRNA 有关。以下为几种常用的 miRNA 效果检测方法：

1. 使用 qPCR，基因芯片，新一代测序等方法检测靶基因 mRNA 转录水平，甚至全基因表达图谱是否发生相应改变；
2. 使用Western Blot，蛋白芯片等方法检测靶基因的蛋白水平是否发生相应改变；
3. 检测细胞功能（细胞增殖、细胞凋亡、细胞迁移等）是否发生相应变化；
4. 通过靶基因 siRNA 来确认 miRNA mimic/inhibitor 的作用；
5. 通过与 miRNA 靶基因双荧光素酶报告载体（Biomics 可提供构建服务）共转来验证 miRNA mimic/inhibitor 的作用

# 动物实验：

## Biomics 提供动物实验用的各种修饰 miRNA 产品及脂质体包载 RNA 制剂服务。

1. miRNA 动物实验的体内环境复杂，实验周期长，对 miRNA 产品的稳定性提出了更高的要求。
2. m i R N A 动物实验方法主要分为两类，局部作用和全身作用。Biomics 推荐采用稳定性更好、可靠性更高的化学修饰 miRNA agomir 和 antagomir 进行动物实验或脂质体包载的方式，具体方案需要依据实验目的及条件而定